УДК 619:616:98:579.873.21:636.22/28

Субботин В.В.,. Карайченцев Д.В., Карайченцев В.Н.

ПЛОТНАЯ СЕЛЕКТИВНАЯ ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ МОРАКСЕЛЛ

Ключевые слова: инфекционный кератоконъюнктивит, крупный рогатый скот, диагностика, патологоанатомический материал, питательные среды, моракселлы.

Резюме: Цель исследований - разработка плотной селективной питательной среды для изоляции и культивирования из патологического материала, а также очистки загрязненных культур Moraxella bovis. На основании проведенных исследований установили, что при исследовании патологического материала от крупного рогатого скота, плотная селективная питательная среда эффективнее по сравнению с кровяным агаром Хоттингера в 2,82 раза. Использование данной среды позволяет повысить результативность бактериологических исследований патологического материала, сократить время выделения культур Moraxella bovis, своевременно поставить диагноз на инфекционный кератоконъюнктивит. Применение среды позволит более современными методами проводить выделение, культивирование и очистку загрязненных культур Moraxella bovis и проведение необходимых лечебно-профилактических мероприятий. Применение разработанной нами плотной селективной питательной среды для выделения культур Moraxella bovis позволит более эффективно выявлять больных животных в хозяйствах.

Введение

В настоящее время среди болезней крупного рогатого скота особое место занимает инфекционный кератоконъюнктивит, который имеет широкое распространение в различных странах и на различных континентах и протекает в виде энзоотий и даже эпизоотий. Болезнь причиняет большой экономический ущерб странам с высокоразвитым молочным и мясным скотоводством. Он связан с тем, что у коров, больных кератоконъюнктивитом, уменьшается молочная продуктивность, у телят – на 25-30% снижаются привесы, ухудшаются нагулы у животных, что является причиной приводящей их к яловости. Массовые вспышки и широкое распространение болезни чаще наблюдаются в весеннее – летний период, но они так же регистрируются в любое время года, среди всех возрастных групп крупного рогатого скота. Заболеваемость при этом может достигать 60-90% от числа восприимчивых животных.

Данные отечественной и зарубежной литературы свидетельствуют о том, что инфекционный кератоконъюнктивит вызывается бактериями *Moraxella bovis*, которые отнесенны в порядок грамотрицательные, неферметирующие кокки и коккобациллы, семейство *Neisseriaceae*, род *Moraxella*, обитающие на слизистых оболочках животных [1,2,3].

Необходимо отметить, что в настоящее время диагноз на данное заболевание ставят на основании характерных клинических признаков болезни, с учетом анализа эпизоотических данных и с обязательным проведением лабораторной диагностики. Основой лабораторной диагностики являются бактериологические исследования на выделение чистой культуры *Moraxella bovis* и идентификацию возбудителя [4,5,6].

Многочисленными исследованиями установлено, что изоляция возбудителя инфекционного керотоконъюнктивита *Moraxella bovis* из патологического материала на плотных питательных средах (обогащенных дефибрированной кровью крупного рогатого скота и дрожжевым экстрактом) представляет большие трудности. Это связано с тем, что уже на начальных стадиях болезни к основному возбудителю присоединяется большое количество условно-патогенной микрофлоры, которая существенно отягощает течение болезни. При бактериологическом исследовании патологического лабораторного материала, взятого с поверхности глазного яблока из пространства за третьим веком (серозно-слизистое, серозно-гнойное истечение), у больных кератоконъюнктивитом животных кроме *Moraxella bovis*, выделяются диплококки, тетракокки, стафилококки, протей, эшерихии, сальмонеллы, риккетелы, вирусы, сапрофитные грибы, уреплазмы. В большинстве своем вышеперечисленные условно-патогенные микроорганизмы менее требовательны к питательным средам и условиям культивирования. Их быстрый рост и размножение на питательных средах ограничивает или полностью подавляет развитие основного возбудителя *Moraxella bovis* и удлиняют

сроки выделения моракселл [7,8,9,10].

В доступной нам литературе не удалось обнаружить сведений о наличии и применении в отечественной или зарубежной лабораторной практике бактериологической диагностики инфекционного кератоконъюнктивита селективных для *Moraxella bovis* питательных сред. Очевидно, что их наличие и применение позволит сократить временные и материальные издержки при постановке диагноза и, как следствие, повысить эффективность противоэпизоотических мероприятий, проводимых при данном заболевании.

Материал и методы

На основании вышеизложенного целью наших исследований была разработка плотной селективной питательной среды для изоляции из патологического материала и получения чистых культур *Moraxella bovis*.

Для достижения поставленной цели нами решались три ключевые задачи: изыскание основы для плотной питательной среды; подбор стимуляторов роста моракселл и подбор ингибиторов роста условно-патогенной микрофлоры.

В качестве основы для плотной селективной питательной среды были испытаны мясо-пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки, перевар Хоттингера. Изучено влияние на рост культур *Moraxella bovis* на вышеуказанных питательных средах дефибринированной крови барана, кролика, крупного рогатого скота, дифосфопиридиннуклеотида, гемина, экстракта пекарских дрожжей, доксициклина, спиктиномицина, резорцина, нистатина и ряда других антибактериальных химиотерапевтических препаратов.

В исследованиях использовали как выделенные ранее, так и свежевыделенные культуры *Moraxella bovis*, другие виды микроорганизмов, высевавшихся из патологического материала наряду с основным возбудителем болезни и патологический материал от естественно больных и искусственно зараженных инфекционным кератоконъюнктивитом животных.

Проведенными исследованиями установлено, что наиболее полно питательным потребностям *Moraxella bovis* отвечает плотная питательная среда на основе перевара Хоттингера, а рост моракселл на данной среде при добавлении дефибринированной крови крупного рогатого скота и экстракта пекарских дрожжей, значительно улучшается. При испытании мясо-пептонного агара и сухого питательного агара из гидролизата кильки выяснили, что рост культур *Moraxella bovis* был очень скудным или отсутствовал. Следовательно, данные питательные среды не отвечают питательным потребностям мораселл.

При изучении чувствительности/устойчивости моракселл и сопутствующей микрофлоры к антибактериальным химиотерапевтическим препаратам мы установили, что спиктиномицин в дозе 10мкг/мл и резорцин в дозе 25 мкг/мл при добавлении в плотную питательную среду на основе перевара Хоттингера в значительной мере подавляют рост посторонней микрофлоры и не угнетают развитие *Moraxella bovis*.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили определить компонентный состав плотной селективной для *Moraxella bovis* питательной среды. Ее основой должен служить перевар Хоттингера, в качестве стимуляторов роста использовать дефибрированную кровь крупного рогатого скота и экстракт пекарских дрожжей, а в качестве ингибиторов роста сопутствующей микрофлоры - спиктиномицин и резорцин.

Результаты и обсуждение

Дальнейшие исследования проводили с использованием питательной среды именно этого состава. Использовали ее для выделения чистых культур *Moraxella bovis* из патологического материала (серозно-гнойные истечения из глаз) от крупного рогатого скота. Для этого каждый исследуемый образец материала рассевали методом Дригальского на 3 чашки Петри. Посевы инкубировали в термостате при t 37^{0}C в течение 24-28 часов. Как правило, рост культур возбудителя наблюдали через 24 часа. Моракселлы формировали на поверхности агара колонии, которые обнаруживали визуально по зонам полного гемолиза вокруг них (бета-гемолиз) шириной 0,5-1,0 мм (в ряде случаев гемолиз мог отсутствовать). Другими характерными признаками колоний, по которым мы и отбирали их для дальнейших исследований, были: диаметр от 1 до 3 мм; круглая форма и плоская поверхность; серо-белый цвет; рыхлая консистенция, характерный вдавленный в поверхность среды тип роста.

При обнаружении на плотной селективной питательной среде колоний, характерных для возбудителя, из 2-3 колоний делали мазки, которые окрашивали по Грамму и микроскопировали. При наличии в мазках бактерий с характерной морфоло-

гией, из указанных колоний делали посевы на сывороточный бульон Хоттингера. После 24-28 часов культивирования изучали рост на данном бульоне, готовили мазки, окрашивали их по Грамму и микроскопировали.

На сывороточном бульоне Хоттигера моракселлы давали рост в виде незначительного помутнения среды с образованием осадка на дне пробирки, который при встряхивании образовывал равномерную мелкозернистую суспензию. В мазках обнаруживали грамотрицательные палочки и коккобактерии, с закругленными концами, размером 1,0-1,5 1,5-2,5мкм, располагающиеся в поле зрения микроскопа одиночно, попарано или в виде коротких цепочек. Спор и капсул не выявляли, тест на подвижность был отрицательным.

На следующем этапе исследований с использованием вновь разраборанной селективной питательной среды провели успешное выделение чистых культур *Moraxella bovis* из 18 образцов смешанных культур. Работу проводили аналогичным образом, включая изучение культуральных и морфологических свойств бактерий из очищенных культур возбудителя.

Полученные данные показали, что использование вновь разработанной плотной селективной питательной среды для выделения из патологического материала или для выделения из смешанных образцов чистых культур возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота не ведет к изменению культуральных и морфологических свойств *Moraxella bovis*, характерных для данного вида.

На завершающем этапе исследований изучили эффективность использования в бактериологической диагностике инфекционного кератоконъюнктивита вновь разработанной селективной питательной среды. С этой целью образцы патологического материала от больных животных высевали параллельно на 4 различные питательные среды (плотная селективная питательная среда, мясо-пептонный агар, сухой питательный агар из гидролизата кильки и кровяной агар Хоттингера). Посевы инкубировали в термостате при 37С^0 в течение 24-48 часов и учитывали результаты, как описано выше.

Всего исследованию было подвергнуто 583 пробы. На вновь разработанной селективной питательной среде было выделено 285 культур *Moraxella bovis* (частота выделения 48,89%), на кровяном агаре Хоттингера – 101 культура (частота выделения 17,37%). На двух других испытуемых средах моракселл выделить не удалось.

Выводы

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие основные выводы: плотная селективная питательная среда на основе перевара Хоттингера в наибольшей степени отвечает ростовым потребностям *Moraxella bovis*; добавление в питательную среду дефибрированной крови крупного рогатого скота и экстракта пекарских дрожжей обеспечивает для возбудителя ростостимулирующий эффект, а внесение спиктомицина и резорцина – ингибирующий эффект в отношении сопутствующей микрофлоры; вновь разработанная плотная селективная для *Moraxella bovis* питательная среда обеспечивает сохранение характерных для вида культурально-морфологических свойств и повышение эффективности бактериологических исследований по обнаружению и выделению из патологического материала *Moraxella bovis* в 2,82 в сравнении с традиционно используемых для этих целей кровяным агаром Хоттингера.

Таким образом, применение вновь разработанной плотной селективной питательной среды для выделения культур *Moraxella bovis*, позволит сократить временные и материальные издержки при постановке диагноза на инфекционный кератоконъюнктивит и, как следствие, повысить эффективность противоэпизоотических мероприятий, проводимых при данном заболевании.

Библиографический список:

1. Инфекционные кератоконъюнктивиты крупного рогатого скота /Борисевич В.Б.[и др.] // Ветеринария. - 2006. - №1. – С.18-19.
2. Дрожжина А.С., Назаров М.В., Родин И.А. Этиология конъюнктивита в ОАО агрокомплекс Гиганский им. Ю.Х. Тхайцухова и ОАО ГПЗ Гулькевский // ФГБОУ ВПО Кубанский государственный аграрный университет, Краснодар. - 2013.
3. Карайченцев В.Н. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота, вызываемый Moraxella bovis // Материалы Международной конференции БГСХА. - Улан-Удэ. - 2003.- С.117.
4. Карайченцев В.Н. Характеристика Moraxella bovis, выделенных от крупного рогатого скота // Материалы Международной конференции – БГСХА. - Улан-Удэ. - 2003.- С.118.
5. Карайченцев В.Н. Выделение и идентификация возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота. Проблемы сельскохозяйственного производства на современном этапе и пути их решения: Мат 8-й межд.

научн.-произв.. конф. - Белгород, 2004. – С.54-55.
6. Карайченцев В.Н. Диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота, вызываемого Moraxella bovis // Материалы Международной конференции ГАВМ. - Санкт-Петербург. - 2004.
7. Карайченцев В.Н. Лабораторная диагностика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота // Доклады Россельхозакадемии. - 2005. - №6. – С. 51-52.
8. Препарат для лечения и профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и способы его применения / Шкиль Н.Н. [и др.] // ГНУ ИЭВ и ДВ СО Россельхозакадемии. - Новосибирск, 2010.
9. Щербакова Е. П. Совершенствование и повышение эффективности специфической профилактики конъюнктиво-кератита крупного рогатого скота : автореф. дис. ... канд. вет. наук: 06.02.04 . - Троицк, 2013. - 20 с.
10. Щербакова Е.П. Зависимость иммунореактивности крупного рогатого скота от стресса в ООО «Агрофирма Калининское» Брединского района Челябинской области /Е.П. Щербакова, Т.Н. Шнякина, П.Н. Щербаков // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – Барнаул, 2012. - С. 95-96.

References:

1. Infekcionnye keratokon"junktivity krupnogo rogatogo skota [Infectious bovine keratoconjunctivitis] / Borisevich V.B.[i dr.] // Veterinarija. - 2006. - №1. – S.18-19.
2. Drozhzhina A.S., Nazarov M.V., Rodin I.A. Jetiologija kon"junktivita v OAO agrokompleks Giganskij im. Ju.H. Thajcuhova i OAO GPZ Gul›kevskij [The etiology of conjunctivitis in agro Huge them. YK Thaytsuhova and Gulkevsky] // FGBOU VPO Kubanskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet, Krasnodar. - 2013.
3. Karajchencev V.N. Infekcionnyj keratokon"junktivit krupnogo rogatogo skota, vyzyvaemyj Moraxella bovis [Infectious bovine keratoconjunctivitis caused by Moraxella bovis] // Materialy Mezhdunarodnoj konferencii BGSHA. - Ulan-Udje. - 2003.- S.117.
4. Karajchencev V.N. Harakteristika Moraxella bovis, vydelennyh ot krupnogo rogatogo skota [Characteristics of Moraxella bovis, isolated from cattle] // Materialy Mezhdunarodnoj konferencii – BGSHA. - Ulan-Udje. - 2003.- S.118.
5. Karajchencev V.N. Vydelenie i identifikacija vozbuditelja infekcionnogo keratokon"junktivita krupnogo rogatogo skota [Isolation and identification of the causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis]. Problemy sel›skohozjajstvennogo proizvodstva na sovremennom jetape i puti ih reshenija: Mat 8-j mezhd. nauch.-proizv.. konf. - Belgorod, 2004. – S.54-55.
6. Karajchencev V.N. Diagnostika infekcionnogo keratokon"junktivita krupnogo rogatogo skota, vyzyvaemogo Moraxella bovis [Diagnosis of infectious bovine keratoconjunctivitis caused by Moraxella bovis] // Materialy Mezhdunarodnoj konferencii GAVM. - Sankt-Peterburg. - 2004.
7. Karajchencev V.N. Laboratornaja diagnostika infekcionnogo keratokon"junktivita krupnogo rogatogo skota [Laboratory diagnosis of infectious bovine keratoconjunctivitis] // Doklady Rossel›hozakademii. - 2005. - №6. – S. 51-52.
8. Preparat dlja lechenija i profilaktiki infekcionnogo keratokon"junktivita krupnogo rogatogo skota i sposoby ego primenenija [The drug for the treatment and prophylaxis of infectious bovine keratoconjunctivitis and methods for its use] / Shkil› N.N. [i dr.] // GNU IJeV i DV SO Rossel›hozakademii. - Novosibirsk, 2010.
9. Shherbakova E. P. Sovershenstvovanie i povyshenie jeffektivnosti specificheskoj profilaktiki kon"junktivo-keratita krupnogo rogatogo skota [Improved and Effective etioprophylaxis konjunktivo-keratitis of cattle]: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk: 06.02.04 . - Troick, 2013. - 20 s.
10. Shherbakova E.P. Zavisimost› immunoreaktivnosti krupnogo rogatogo skota ot stressa v OOO «Agrofirma Kalininskoe» Bredinskogo rajona Cheljabinskoj oblasti [Dependence immunoreactivity cattle from the stress of Agrofirm Kalininskoe Chelyabinsk region] /E.P. Shherbakova, T.N. Shnjakina, P.N. Shherbakov // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – Barnaul, 2012. - S. 95-96.

Subbotin V. V., Karaychentsev D. V., Karaychentsev V. N.

SOLID SELECTIVE MEDIUM FOR MORAXELLA EXTRACTION

Key Words: infectious keratoconjunctivitis, bovine cattle, diagnostics, autopsied material, growth media, Moraxella.

Abstract: The study was aimed at development of solid selective growth media intended for isolating from pathology material, cultivation and purification of contaminated Moraxella bovis cultures. The study led to conclusion that solid selective growth media is 2.82 times more effective for examination of pathology material from bovine cattle than Hottinger blood agar. Use of this media provides for improved effectiveness of bacteriological test on pathology material, and decreased time of Moraxella bovis culture extraction, thus allowing faster diagnosis of infectious keratoconjunctivitis. The media will make it possible to apply advanced methods of extraction, cultivation, and purification of contaminated Moraxella bovis cultures, thus paving way for necessary treatment and preventive actions. Application of our solid selective media for Moraxella bovis culture extraction makes exposing infected animals at farms more effective.

Сведения об авторах:

Субботин Владимир Викторович, д.в.н., проф., Евразийская экономическая комиссия, Депортамент санитарных, фитосанитарных и ветеринарных мер, Москва, тел.: 8-910-237-55-53; e-mail: subbotinvv@mail.ru

Карайченцев Данила Викторович., аспирант ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р.Коваленко. г.Москва, тел.:8-910-237-24-66, e-mail: karaychencevdv@agrohold.ru.

Карайченцев Виктор Николаевич., д.в.н., проф.; ФГБОУ ВПО «Белгородская ГСХА им. В.Я.Горина», тел.: 8 951-154-35-88; e-mail: ipkabsaa@mail.ru.

Author affiliation:

Subbotin Vladimir Viktorovich, D.Sc. in Veterinary Medicine, Prof., Eurasian Economic Commission, Deportament sanitary, phytosanitary and veterinary measures, Moscow, tel.: 8-910-237-55-53; e-mail: subbotinvv@mail.ru.

Karaychentsev Daniel Viktorovich, PhD student All-Russia Research Institute of Experimental Veterinary Medicine Ya.R.Kovalenko, Moscow, tel.: 8-910-237-24-66, e-mail: karaychencevdv@agrohold.ru.

Karaychentsev Viktor Nikolaevich, D.Sc. in Veterinary Medicine, Prof.; VPO «Belgorod State Agricultural im.V.Ya.Gorina», tel.: 8 951-154-35-88; e-mail: ipkabsaa@mail.ru

УДК 619:616:98:579.873.21:636.22/28

Субботин В.В., Карайченцев Д.В., Карайченцев В.Н

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВЫДЕЛЕННЫХ КУЛЬТУР *MORAXELLA BOVIS*

Ключевые слова: инфекционный кератоконъюнктивит, крупный рогатый скот, диагностика, биохимические, патогенные свойства моракселл.

Резюме: Изучены биологические свойства выделенных культур *Moraxella bovis*. Бактериологическому исследованию было подвергнуто 583 пробы патологического материала от коров, телок и телят и выделили 285 (48,89%) культур *Moraxella bovis*. Все выделенные культуры *Moraxella bovis* не утилизировали ацетат натрия, не восстанавливали нитраты до нитритов, не ферментировали углеводы, не образовывали индол и не обладали подвижностью, не росли на средах с 6% хлорида натрия, Мак-Конки, с желчными солями и при температуре 6^0 С. Все культуры *Moraxella bovis* разжижали желатин, обладали каталазной активностью и вызывали гемолиз на кровяном агаре. Они вызывали характерные для *Moraxella bovis* изменения в лакмусовом молоке. Выделенные из пораженных глаз гемолитические культуры *Moraxella bovis* обладают патогенностью для телят 2-3 месячного возраста при введении им в нижний конъюнктивальный мешок глаза 0,5 мл суспензии культуры *Moraxella bovis*. Данные культуры *Moraxella bovis* обладают патогенностью для белых мышей при подкожном введении им 0,5 мл суспензии культуры *Moraxella bovis*.

Введение

Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота вызываемых *Moraxella bovis* – острая, контагиозная, быстрораспространяющаяся болезнь, характеризующаяся слезотечением, светобоязнью, гиперемией сосудов конъюнктивиты, блефароспазмом, иридоспазмом, серозно-слизистым, а затем серозно-гнойным истечением из пораженных глаз, помутнением и изъязвлением роговицы.

Данное инфекционное заболевание, по мнению многих иностранных исследователей, занимает одно из ведущих место в инфекционной патологии крупного рогатого скота, которое причиняет большой экономический ущерб животноводству.

Возбудителем болезни являются патогенные штампы *Moraxella bovis*, которые являются грамотрицательной, некислоустойчивой, полиморфной, округлой, коккобациллой с округлыми концами. Возбудитель обладает выраженным тропизмом к слизистым оболочкам и вырабатывает токсин, который раздражает и разрушает оболочки глаза [1,2,3,4].

Диагноз на данное заболевание устанавливают на основании анализа эпизо-